

A kutatási eredmények összefoglalása

A./ A hem-oxigenáz és a nitrogén monoxid szintáz reakcióutak kölcsönhatásai az agyi vérkeringés szabályozásában

Célkitűzések/A.

Az endogén endogén szénmonoxid (CO) hemből képződik a hemoxigenáz (HO) által katalizált reakció során. Az utóbbi évek kutatásai számos élettani és kórélettani folyamatban igazolták a CO szabályozó, ill. mediátor szerepét, az agyi vérkeringésre gyakorolt hatásait azonban alig vizsgálták. Kísérleteink célja az volt, hogy tisztázzuk a CO esetleges hatásait az agyi erek tónusára és az agyszövet perfúziójára. Mivel az egyébként is igen magas HO aktivitást mutató agyszöveten belül is a hypothalamusban viszonylag nagy mennyiségben expresszálódik ezen enzim, először e régió véráramlását vizsgáltuk. Ezután megvizsgáltuk HO-CO reakcióút szerepét az agykérget ellátó arteria cerebri media (MCA) tónusára in vitro, valamint az agykéreg perfúziójára in vivo. A CO közvetlen hatásai mellett a nitrogén monoxiddal (NO) való esetleges kölcsönhatásaira is próbáltunk fényt deríteni.

Eredmények/A1. (Hypothalamikus véráramlás)

Urethánnal altatott spontán légző felnőtt hím Wistar patkányokban hidrogén-clearance technikával vizsgáltuk a hypothalamus véráramlását. A HO-gátlószer zinc deuteroporphyrin 2,4-bis-glycol (ZnDPBG, 45 $\mu\text{mol/kg}$, ip.) nem befolyásolta sem az általános vérkeringési paramétereket, sem pedig a hypothalamus véráramlását, ill. érellenállását a beadását követő 15., 30., ill. 45. percben. Meglepő módon azonban szignifikánsan fokozta a hypothalamusban az NO szintáz (NOS) aktivitását. Mivel ezen utóbbi hatás következtében a véráramlásnak fokozódnia kellett volna, arra a következtetésre jutottunk, hogy a ZnDPBG-nek volt egy vazokonstriktor hatása a hypothalamusban, amit a fokozódó NO-szintézis miatt kialakuló vazodilatáció kiegyenlített. E hipotézisünk tesztelésére megvizsgáltuk a ZnDPBG hatását úgy is, hogy előtte a NOS-t nitro-L-arginin-metil-észter (L-NAME) adásával gátoltuk. Ebben az esetben a ZnDPBG szignifikánsan növelte az érellenállást és csökkentette a véráramlást. Ezután megvizsgáltuk a ZnDPBG hatását ciklooxigenáz gátlás (10 mg/kg diclofenac iv.) után is, és azt tapasztaltuk, hogy ilyen körülmények között a ZnDPBG szignifikáns véráramlás-fokozódást okoz. Diclofenac és L-NAME együttes jelenlétében a ZnDPBG nem befolyásolta a hypothalamus véráramlását. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az endogén szénmonoxid kettős hatást fejt ki a hypothalamus véráramlására. Egyfelől prosztanoidok által közvetített vazodilatációt vált ki, másrészt viszont gátolja az NO szintézisét és így vazokonstriktort okoz. Összességében e két hatás aránya határozza meg, hogy miként befolyásolja a CO a hypothalamus véráramlását.

Eredmények/A2. (Agykérgi véráramlás)

Urethánnal altatott spontán légző felnőtt hím Wistar patkányok parietális agykérgében a véráramlást (CBF) lézer-Doppler technikával mértük, a parietalis cortexet ellátó MCA simaizomtónusának változásait pedig in vitro miográf rendszerben vizsgáltuk. A HO-gátlószer ZnDPBG (45 $\mu\text{mol/kg}$, ip.) hatására a CBF 17 ± 5 %-kal fokozódott ($p < 0,001$), míg oldószere önmagában hatástalan volt (-2 ± 3 %). A ZnDPBG áramlásnövelő hatása NO szintáz (NOS) gátlása után nem volt szignifikáns ($+5 \pm 6$ %). Izolált, prekontrahált MCA érgyűrűkön 1 μM ZnDPBG nem okozott tónusváltozást ($+1 \pm 3$ %) noha 1 μM bradikinnel jelentős dilatációt lehetett kiváltani (-72 ± 5 %), igazolva az endothelium épségét.

Kísérleteink további szakaszában azt vizsgáltuk, hogy HO-gátlás hatására megváltozik-e a hypoxia és hypercapnia során kialakuló CBF-fokozódás. A belégzett gázkeverékek változtatásával létrehozott közepes ($\text{PaO}_2 \sim 65 \text{ Hgmm}$, $\text{PaCO}_2 \sim 85 \text{ Hgmm}$) valamint súlyos

($\text{PaO}_2 \sim 50 \text{ Hgmm}$, $\text{PaCO}_2 \sim 95 \text{ Hgmm}$) hypoxia/hypercapnia hatására a CBF 41 ± 7 , ill. 50 ± 7 %-kal fokozódott. Ezek az értékek ZnDPBG adása után sem változtak meg szignifikánsan (46 ± 9 %, ill. 57 ± 9 %).

Eredményeink szerint az agykéreg nyugalmi véráramlását az endogén CO a NOS gátlásán keresztül csökkenti, ugyanakkor a hypoxia és hypercapnia során kialakuló CBF-fokozódást nem befolyásolja jelentősen. A ZnDPBG hatástalansága izolált MCA-n azt jelzi, hogy a nyugalmi CBF-et befolyásoló CO-NOS kölcsönhatás legalább egyik komponense neuronális eredetű.

B./ Az agyi vérkeringés alkalmazkodási mechanizmusai a nitrogén monoxid hiányához

Célkitűzések/B.

A nyugalmi NO felszabadulás akut gátlása az agyi értónus fokozódásához és az agyi véráramlás kifejezett csökkenéséhez vezet. Ezzel ellentétben korábbi vizsgálataink eredményei szerint az NO szintézis krónikus gátlásakor az agyi véráramlás nem csökken. Feltételezhető tehát, hogy valami kompenzálja az NO hiányát ebben az állapotban.

Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy milyen kompenzációs mechanizmusok aktiválódnak az agyi vérkeringés területén a NOS krónikus gátlásakor. A NOS-gátlást az általunk kidolgozott modell szerint L-NAME orális adagolásával hoztuk létre, mégpedig úgy, hogy az állatok ivóvizébe kevertük 1 mg/ml koncentrációban 1 héten keresztül. Kísérleteink során három lehetséges kompenzációs mechanizmus szerepét vizsgáltuk:

B1./ Az agyi erek NO-val szembeni válaszkészségének fokozódása

Irodalmi adatok és saját korábbi eredményeink szerint az agyi erek az endogén NO felszabadulás csökkenésekor fokozott érzékenységet mutatnak az NO iránt. Mivel az általunk alkalmazott modellben a konstitutív NOS aktivitása csak mintegy 90 %-kal csökken, elképzelhető, hogy a maradék NO fokozottabb érhatása is hozzájárul a véráramlás normalizálásához.

B2./ A prosztaciklin-felszabadulás fokozódása

Korábbi vizsgálatainkban leírtuk, hogy akut NOS-gátlást követően a liquor cerebrospinalisban szignifikánsan fokozódik a prosztaciklin koncentrációja. Megvizsgáltuk, hogy a prosztaciklin, vagy más vazodilatátor prosztanoid (PGD_2 vagy PGE_2) hozzájárul-e az agyi véráramlás normalizálásához krónikus NOS-gátlás során.

B3./ Az endogén szénmonoxid szerepe

Korábbi kísérleteinkben (l. Eredmények/A1.) azt tapasztaltuk, hogy az endogén CO kettős hatást fejt ki a hypothalamus véráramlására: egyrészt vazodilatációt okoz, másrészt viszont csökkenti az NO szintézist. Ez alapján elképzelhető, hogy NO hiányában előtérbe kerül az endogén CO agyi értónust csökkentő hatása azáltal, hogy a NOS-gátlás által okozott indirekt konstriktor hatása nem érvényesül. Ráadásul a krónikus NOS gátlás során indukálódhat a hemoxigenáz-1 enzim expressziója és ezáltal fokozódhat a CO-felszabadulás. Így a CO lehet az egyik agyi véráramlást normalizáló tényező krónikus NO-hiányos állapotban.

Eredmények/B.

Az L-NAME oldatot ivó állatok folyadékfogyasztása (96 ± 5 ml/kg/nap) nem különbözött szignifikánsan a vizet ivó kontroll állatokétól (101 ± 7 ml/kg/nap). A krónikusan NOS-gátolt állatok napi L-NAME fogyasztása 96 ± 5 mg/kg/nap volt. Egy hétig tartó L-NAME előkezelést követően az állatok artériás középnyomása (140 ± 7 Hgmm) szignifikánsan magasabb volt, mint a vizet ivó kontroll állatoké (98 ± 4 Hgmm). A hypothalamus véráramlása (HBF) az L-

NAME oldatot illetve vizet ivó kísérleti csoportokban közel azonos volt ($0,87 \pm 0,04$ vs. $0,85 \pm 0,04$) annak ellenére, hogy a hypothalamus NOS aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt az L-NAME-val előkezelt állatokban ($1,19 \pm 0,16$ pmol L-citrullin / mg protein / perc), mint a kontrollokban ($4,85 \pm 1,19$ pmol L-citrullin / mg protein / perc). A nyugalmi artériás vérgáz-tenziók valamint a pH nem különbözött szignifikánsan a két csoport között.

Intravénás L-arginin infúzió (10 mg/kg/perc, 40 percig) hatástalan volt a vizsgált vérkeringési paraméterekre. Ezzel szemben, L-arginin infúzió a krónikus L-NAME kezeléssel átesett állatokban a hypothalamus hyperaemiáját okozta, miközben az artériás középnyomást lecsökkentette a fiziológiai szintre. Ez a megfigyelés arra mutat, hogy a krónikus NOS-gátlás során aktiválódott kompenzációs mechanizmus az NO termelés akut normalizálása után is aktív maradt.

Feltételeztük, hogy a krónikus NOS-gátlást követően fennmaradó alacsony intenzitású NO-képződés hozzájárulhat a HBF normalizálódásához azáltal, hogy az agyi erek fokozottan érzékenyekké válnak az NO-val szemben. Ezért megvizsgáltuk, hogy 50 mg/kg i.v. dózisban alkalmazott L-NAME hogyan befolyásolja a HBF-et a két kísérleti csoportban. A kontroll állatokban akut L-NAME kezelés hatására a HBF jelentősen lecsökkent. Ezzel szemben az L-NAME oldatot ivó állatokban az intravénásan adott L-NAME annak ellenére sem változtatta meg a HBF-et, hogy tovább csökkentette a hypothalamus NOS aktivitását. Ez alapján valószínűtlen, hogy a krónikus NOS-gátlás során fennmaradó alacsony intenzitású NO-képződés szignifikánsan hozzájárulna a HBF normalizálódásához.

Ezután megvizsgáltuk a vazodilatátor prosztanoid vegyületek esetleges kompenzációs szerepét. Azt tapasztaltuk, hogy az 1 hetes L-NAME előkezelés során fokozódott a prosztaciklin stabil anyagcseretermékének, a 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ -nak a koncentrációja a vizeletben. A liquor cerebrospinalisban azonban egyik vazodilatátor prosztanoid metabolit koncentrációja sem volt magasabb az L-NAME-val előkezelt kísérleti csoportban, mint a kontrollban. RT-PCR és Western blot vizsgálat igazolta mindhárom ciklooxygenáz (COX-1, COX-2, COX-3) konstitutív expresszióját kontroll állatok hypothalamusában, azonban egyik izoforma sem mutatott fokozott expressziót a krónikus NOS-gátlással átesett állatokban.

Diclofenac (10 mg/kg, i.v.) egyik kísérleti csoportban sem befolyásolta a HBF-et. Ezzel szemben indomethacin (5 mg/kg, i.v.) HBF csökkenést okozott, de hatása nem különbözött a két kísérleti csoportban. Az indomethacin oldószere önmagában hatástalan volt.

Eredményeink szerint egy vagy több vazodilatátor prosztanoid COX-1 által történő termelődése hozzájárul a hypothalamus véráramlásának fenntartásához nyugalmi körülmények között és NO-hiányos állapotban. E vazodilatátor prosztanoid mechanizmus azonban nem erősödik fel krónikus NOS-gátlás során, így nem járulhat hozzá a HBF NO-hiányhoz történő alkalmazkodásához.

Végül megvizsgáltuk az endogén CO esetleges kompenzációs szerepét krónikus NOS-gátlás során. Mindkét HO izoenzim (HO-1 és HO-2) expresszióját sikerült igazolni a hypothalamusban, azonban egyik izoforma sem mutatott fokozott expressziót a krónikus NOS-gátlással átesett állatokban. Mivel a HO gátlószer ZnDPBG egyik kísérleti csoportban sem változtatta meg szignifikánsan a HBF-et, gyakorlatilag kizárható, hogy az endogén CO hozzájárulna a hypothalamus vérkeringésének krónikus NO-hiányhoz történő alkalmazkodásához.

C./ A NOS és COX reakcióutak kölcsönhatásainak vizsgálata az agy és a szívizom vérellátásának szabályozásában

C1./ A NOS és a prosztaglandin H₂/tromboxán A₂ reakcióutak kölcsönhatásai az agykérgi vérkeringés területén

Célkitűzések/C1.

Az NO szintézis gátlásakor két fontos változás tapasztalható az agyi vérkeringés területén. Egyfelől az érellenállás fokozódása és a véráramlás csökkenése alakul ki, másfelől a véráramlás időbeli mintázata is megváltozik: gyakran a szöveti véráramlás jelentős oszcillációja tapasztalható. E jelenségek izolált agyi artériákon is vizsgálhatók, ugyanis az NO-szintézis gátlásakor az erek kontrahálódnak és spontán tónusváltozásokat, vazomóciót mutatnak. Patkány MCA érgyűrűkén korábban leírtuk, hogy a nyugalmi NO felszabadulás a vazokonstriktor prosztaglandin H₂/tromboxán A₂ (PGH₂/TXA₂) reakcióút gátlásán keresztül szabályozza az értónust. In vivo kísérleteinkben azonban azt tapasztaltuk, hogy liquor cerebrospinalis TXA₂-koncentrációja nem változik meg az NO-szintézis gátlásakor. Ez alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az NO valószínűleg nem a TXA₂-felszabadulást, hanem az érsimaizomzat tromboxánnal szembeni válaszkészségét befolyásolja. In vitro és in vivo kísérleteket végeztünk annak eldöntésére, hogy az NO-szintézis csökkenésekor fokozódik-e az érsimaizomzat tromboxánnal szembeni válaszkészsége, és ez a jelenség hozzájárulhat-e a vazomóció és az agyszöveti perfúzió ingadozásainak (véráramlás-oszcilláció) kialakulásához.

Eredmények/C1.

Először hím Wistar patkányokból izolált MCA szegmenteken vizsgáltuk kis dózisú (100 nM) tromboxán-receptor agonista (U-46619) hatásait. Kontroll erekben az U-46619 gyenge kontrakciót okozott (21±9%, a 124 mM K⁺ hatásához viszonyítva), vazomóciót azonban nem tapasztaltunk. A NO-szintézis 100 μM L-NAME-val történő gátlását követően az U-46619 kontrakciós hatása jelentősen nagyobb volt (54±9%, p=0,02) és valamennyi érben vazomóciót okozott. A vazomóció Fourier-spektrumának csúcsa 49±2 mHz-nél volt.

In vivo kísérleteinkben az MCA ellátási területéhez tartozó parietális agykéreg véráramlását (CBF) vizsgáltuk altatott patkányokban lézer-Doppler (LD) technikával. Fiziológias körülmények között 1 μg/kg iv. adott U-46619 sem kvantitatív, sem kvalitatív változást nem okozott a CBF-ben, és az általános vérkeringési paramétereket sem változtatta meg. L-NAME (100 mg/kg iv.) hatására a CBF oszcillálni kezdett, melynek Fourier-analízissel meghatározott csúcsa 144±10 mHz-nél volt. Ezt követően U-46619 adására az oszcilláció jellemző frekvenciája nem változott (144±11 mHz), ugyanakkor amplitúdója 54±12%-kal fokozódott (p<0,001). Eredményeink szerint az agyi érrendszer NO hiányában fokozott érzékenységet mutat a tromboxán-receptorok aktiválódására, és ez kórosan fokozott vazomócióhoz ill. vazospazmushoz vezethet.

C2./ A prosztaciklin szerepe a szív perfúziójának és pumpafunkciójának fenntartásában az NO szintézis gátlását követően

Célkitűzések/C2.

A prosztaciklin szerepét vizsgáltuk a koronária-keringés NO-hiányhoz történő alkalmazkodásában. Korábbi in vivo kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy az NO szintáz gátlását követően percekben belül lecsökkenő koronária-véráramlás valamelyest normalizálódik a következő 40 percben. Megvizsgáltuk tehát, hogy van-e a prosztaciklinnek kompenzációs szerepe a szív vérkeringésében.

Eredmények/C2.

Patkányokból izolált szíveket vizsgáltunk állandó nyomású Langendorff perfúziós rendszerben. A koronária-áramlás mellett regisztráltuk a bal kamrai pulzusnyomást és a szívfrekvenciát, a szívből távozó perfúziós folyadékban pedig CLIA módszerrel meghatároztuk a prosztaciklin stabil metabolitjának (6-keto-proszttaglandin $F_{1\alpha}$) koncentrációját. A méréseket elvégeztük a NOS inhibitor L-NA folyamatos adagolása előtt, majd 10 percenként 40 percig. A szívek egyik csoportjában a perfúziós folyadék indometacint tartalmazott. Indometacin önmagában egyik vizsgált paramétert sem változtatta meg. Indometacin jelenlétében azonban szignifikánsan fokozódott az L-NA koronária-áramlást csökkentő hatása a 10. percet követően, és a szív munka csökkenéshez vezetett. (Önmagában sem az L-NA sem pedig az indometacin nem befolyásolta szignifikánsan a szív munkát.) A perfúziós folyadékban a kezeletlen kontroll csoporthoz képest magasabb volt a prosztaciklin-koncentráció azokban a szívekben, melyek L-NA-t kaptak. Úgy tűnik tehát, hogy az NO hiányában fokozódó prosztaciklin-felszabadulás hozzájárul a szív perfúziójának és pumpa-funkciójának fenntartásához.

D./ Endothélium-függő érválaszok vizsgálata egérben

D1./ Metodikai vizsgálatok

Célkitűzések/D1.

Eredeti munkatervünkben az NO-hiányhoz történő alkalmazkodás mechanizmusainak vizsgálatára kizárólag a krónikus NOS-gátlás modelljét terveztük. Időközben azonban könnyen elérhetővé vált az endotheliális NOS (eNOS) deficiens egértörzs, melynek segítségével számos fontos kérdés vizsgálatára nyílik lehetőség. E célból előkísérleteket végeztünk vad típusú (C57BL/6J) valamint eNOS knockout (eNOS^{-/-}) egerekből izolált thoracalis aortán (TA) azzal a céllal, hogy néhány metodikai kérdést tisztázzunk.

Először azt vizsgáltuk, hogy a vér eltávolítása az érlumenből a kísérlet előtt javítja-e az in vitro endothélium-függő érválaszokat. Tanulmányoztuk továbbá a regionális különbségeket a TA proximális és disztális szakasza között az endothélium-függő reaktivitás tekintetében. A carbachol, ATP és thrombin által kiváltott relaxációkat eNOS^{-/-} egerekből preparált TA-n is vizsgáltuk annak eldöntésére, hogy milyen mértékben vesz részt az endothéliumból történő NO felszabadulás az érválaszok közvetítésében. Végül megvizsgáltuk, hogy jobb ex vivo reaktivitást mutatnak-e olyan állatokból származó TA-k, akiket négy hétig futókerékkel felszerelt ketrecben tartottunk.

Eredmények/D1.

A kísérleteket felnőtt, hím egereken végeztük. Közülük egy csoportot a kísérlet kezdete előtt négy héttel futókerékkel felszerelt ketrecbe helyeztünk, ahol szabadon futhattak. A kontroll állatokat mély éter anesztéziában elvégeztettük, a többi egeret pedig – köztük az eNOS^{-/-} és a futókerékkel felszerelt ketrecben tartott állatokat is – heparinnal (100 IU, i.p.) előkezeltük és 10 ml heprinos (10 IU/ml) Krebs-oldattal transzkardiálisan perfundáltuk az elvégeztetés során. Mindegyik csoportban 3 mm hosszú, a disztális és a proximális TA szakaszból származó érgyűrűket preparáltunk, amelyeken miográf segítségével mértük az izometriás értónust. Carbachol, ATP, thrombin, valamint az NO donor nátrium nitroprusszid relaxációs hatását határoztuk meg 10 μ M PGF_{2 α} által kiváltott prekontrakció után.

Mind a carbachol, mind az ATP, mind a thrombin hatása szignifikánsan nagyobb volt a perfundált csoportban, mint a kontroll állatokban. Ezzel szemben a nátrium nitroprusszid által kiváltott válaszok nem különböztek a perfundált és nem perfundált aortákban, így megállapítható, hogy az NO-ra adott simaizom-válasz nem különbözött a két csoportban. A

carbachol szignifikánsan nagyobb relaxációs válaszokat idézett elő a disztális TA-ban, mint a proximálisban, míg a thrombin, ATP, nátrium nitroprusszid esetében nem találtunk ilyen regionális különbséget. Thrombin, ATP és szubmikromoláris koncentrációjú carbachol nem relaxálta az eNOS^{-/-} állatok TA-it, így ezen érválaszokat kizárólag az endothéliumból történő NO-felszabadulás közvetíti. Ezzel szemben mikromoláris és annál nagyobb koncentrációban adott carbachol ugyan csökkent, de mégis szignifikáns relaxációt okozott az eNOS^{-/-} aortákban, ami 10 µM indomethacin alkalmazásával sem volt gátolható, viszont eltűnt az endothélium leválasztása után. Úgy tűnik tehát, hogy ezen érválasz közvetítésében szerepet játszik az endothélium-függő hyperpolarizációs faktor is. A nátrium nitroprusszid által kiváltott relaxációs válaszok nem különböztek az eNOS^{-/-} állatokban jelezve a simaizom normális válaszkészségét NO-val szemben. Végül megállapítottuk, hogy a futó egerekből preparált TA-k nem mutatnak jobb reaktivitást egyik vazorelaxáns esetében sem, ami arra utal, hogy a hagyományos ketrecekben tartott egerek mozgásszegény életmódja nem okoz csökkent endothélium-függő érválaszokat a thoracalis aortában.

D2./ Gyulladásos mediátorok érhatásainak vizsgálata

Célkitűzések/D2.

A gyulladásos folyamatok mediátorainak érhatásai fontos elemei az immunválasznak. Az utóbbi évek kutatásai azonban ráirányították a figyelmet a gyulladásos folyamatok patogenetikai szerepére különböző érrendszeri megbetegedésekben (pl. hipertonia, atherosclerosis és diabetes). Az e betegségeket kísérő érelváltozások kialakulásában és progressziójában fontos szerepe van az érfalban zajló gyulladásos folyamatoknak és a következményes szabadgyök-képződésnek. A gyulladásos mediátorok közül a szfingozin-1-foszfát (S1P) legfontosabb forrásai a vérlemezkék és a hízósejtek. Szintézise során a membrán-szfingolipidek lebontásából származó szfingomielint a szfingomielináz enzim ceramiddá alakítja, majd a ceramid szfingozinon keresztül S1P-tá alakul. A S1P szintézisében szereplő ceramid testszerte előfordul és mint másodlagos hírvivő molekula a NADPH oxidázokat aktiválva fokozhatja a szabadgyök-képződést.

A szfingolipid mediátorok érhatásairól viszonylag szegényesek az ismereteink. A S1P receptorainak expresszióját leírták az érsimaizomban és az endothéliumban is. A ceramid pedig S1P-tá alakulva, vagy a vaszkuláris NADPH-oxidázok aktiválása által is hathat az erekre. Ezért kísérleteinkben megvizsgáltuk e mediátorok direkt hatásait egér TA-ra, valamint azt, hogy jelenlétükben megváltozik-e az erek válaszkészsége.

Eredmények/D2.

Elsőként a vizsgált anyagok közvetlen érhatásait határoztuk meg. A nyugalmi értónust sem 1 µM S1P, sem 10 µM ceramid nem befolyásolta. A ceramidnak prekontrahált ereken sem volt hatása. Fenilefrinnel prekontrahált ereken a S1P kifejezett, 76 %-os dilatációt okozott, ez a válasz hiányzott az eNOS^{-/-} egerekből származó ereken.

Ezek után megvizsgáltuk milyen hatással van a ceramid ill. S1P tartós jelenléte az érválaszokra. Az erek kontrakciós válaszkészségét 124 mM K⁺-mal, phenylephrinnel és prosztaglandin F_{2α}-val szemben sem a ceramid (10 µM) sem pedig a S1P (1 µM) nem változtatta meg szignifikánsan. Ezzel szemben a ceramid szignifikánsan csökkentette az acetilkolin, a trombin és az ATP vazodilatátor hatását, míg az NO donor Na-nitroprusszid (SNP) hatását nem befolyásolta. S1P jelenlétében egyik vazodilatátor válasz sem változott meg szignifikánsan.

Igazoltuk tehát, hogy az S1P eNOS által közvetített vazodilatációt okoz, aminek fontos élettani szerepe lehet gyulladásos folyamatokban. A ceramid endotheliális diszfunkciót idéz elő, melynek hátterében a vaszkuláris NADPH oxidáz aktivációja állhat. Mivel a S1P hatására

nem alakult ki az endotélium diszfunkciója, kizárhatjuk, hogy a ceramid hatását S1P felszabadulás és az endotheliális S1P receptorok aktivációja okozná.

E./ A nikotinsav érhatásainak mechanizmusa

Célkitűzések/E.

Évtizedek óta ismert, hogy nikotinsav adására csökken a plazmában a koleszterin, a szabad zsírsavak és a trigliceridek szintje amely hatások alkalmasak diszlipidémia kezelésére. Az e hatásokat közvetítő nikotinsav-receptort (emberben: HM74A, egérben: PUMA-G) 2003-ban azonosították. E receptor aktivációja adipocitákban a cAMP szint csökkenése révén gátolja a hormon-szenzitív lipáz működését és ezzel a trigliceridek lebontását. Ezzel összhangban PUMA-G knock out (PUMA-G^{-/-}) egerekben nem figyelhető meg a szabad zsírsavak és trigliceridek plazmakoncentrációjának csökkenése nikotinsav adása után.

A nikotinsav terápiás alkalmazása során megfigyelték, hogy akut kardiovaszkuláris hatásai is vannak a vegyületnek. Ezek közül a legismertebb a flush-reakció, amely főleg az arcra és a törzs felső felére kiterjedő bőrpírból és égő érzésből áll, és bár ártalmatlan, mégis súlyosan rontja a betegek kooperációs készségét. Kísérleteinkben a nikotinsav akut vaszkuláris hatásainak mechanizmusát vizsgáltuk, különös tekintettel a PUMA-G receptor szerepére a flush-reakció kiváltásában.

Eredmények/E.

A fülkagylót ellátó artéria elsődleges ágában mértük a véráramlást lézer-Doppler technikával vad típusú kontroll és transzgenikus egerekben. Megállapítottuk, hogy nikotinsav-hatására dózis-függő véráramlás-fokozódás jön létre, amely kb. 40 percig tart, és nem jár a vérnyomás vagy a szívfrekvencia megváltozásával. A flush lezajlása után alkalmazott újabb nikotinsav-injekció nem okoz véráramlás-fokozódást, amely emlékeztet az emberben leírt tolerancia-jelenségre. Egy nappal később adva a nikotinsav hatására ismét teljes flush-reakciót tapasztalunk.

Megállapítottuk, hogy a PUMA-G receptor expresszálódik a bőrben, és a receptor mRNS-e kimutatható PUMA-G^{-/-} egerek bőrében is PUMA-G^{+/+} egerekből származó csontvelő transzplantációját követően. PUMA-G^{-/-} egerekben a nikotinsav nem okoz flush-t, azonban a válasz megjelenik PUMA-G^{+/+} egerekből származó csontvelő transzplantációja után. Hízósejt-deficiens egerek a vad-típusú kontrollokhoz hasonlóan reagálnak nikotinsavra. COX-1^{-/-} egerekben azonban nem alakul ki a flush nikotinsav hatására. A prosztaglandin D₂ és E₂ receptorait nem expresszáló DP^{-/-}, EP₂^{-/-} és EP₄^{-/-} egerek csökkent nikotinsav okozta flush-választ mutatnak. Eredményeink szerint a nikotinsav okozta flush reakció közvetítéséért a bőrben található, csontvelőből származó immunsejtek (valószínűleg makrofágok vagy dendritikus sejtek) felelősek. A vazodilatáció létrejöttében kulcsszerepe van a PUMA-G receptorok közvetítésével létrejövő COX-1 aktivációnak és a következményes prosztaglandin D₂- és E₂-felszabadulásnak.